

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)

烂鳃病的研究

I. 细菌性病原的研究

湖北省水生生物研究所鱼病研究室*

提 要

本文主要是报导1972年从患细菌性烂鳃的草鱼和其他鱼的鳃上分离到的病原粘细菌。通过多次人工感染(包括再分离和再感染),证明G₄菌株是草鱼细菌性烂鳃病的病原菌,它能引起草、鲮、鲢、草鲮杂种、团头鲂、鲤等鱼的烂鳃病。对G₄菌株的菌体、子实体、小孢子的形态、培养特性、生理生化特性作了较详细的观察和试验;根据其特征,定名为鱼害粘球菌——新种(*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, sp. nov.)。

较详细地观察了G₄菌株在胰脏液体培养中的群集习性,“柱子”形成、繁殖散发和衰老死亡的全过程。认为“柱子”形成是G₄菌株,也可能是所有鱼类寄生粘细菌所共有的一种运动、繁殖的表现形式,它是不会转化为真正的子实体的。

草鱼细菌性烂鳃病是危害很大的鱼病之一。其病原菌分离的成功,对有效地防治该病,控制该病的流行,提供了有利条件,同时也丰富了研究鱼类寄生粘细菌的学术内容。

一、前 言

据目前所知,草鱼烂鳃病大致可分为三类^[1]:一类是由寄生虫引起的,如鳃隐鞭虫病、口丝虫病、粘孢子虫病、斜管虫病、小瓜虫病、车轮虫病、指环虫病、中华鲩病等;一类是由水生藻状菌引起的,如鳃霉病;第三类是由细菌引起的,常称为细菌性烂鳃病。这三类疾病对草鱼都危害甚大,其中尤以细菌性烂鳃病为最严重。由于此病发病季节长,流行广,全国各地养殖场都有不同程度发生,特别是鱼种饲养阶段,常因此病而造成很大损失。除草鱼外,其他养殖鱼类如青、鲢、鳙、鲤等,以及其他野杂鱼如罗汉鱼、黄鲮鱼等都有此病,从而增加相互感染而蔓延的机会。

细菌性烂鳃病在世界各国也普遍存在,而且温水性鱼类和冷水性鱼类都很流行。1926年美国的Davis氏首先描述了鲢鳙鱼类的细菌性烂鳃病^[3],1927年又作了进一步观察^[4],但并没有分离到病原菌。Rucker et al. 于1949年从细菌性烂鳃病鱼的鳃上分离到若干纤维粘菌属(*Cytophaga*)的粘细菌菌株,但人工感染没有成功^[5]。Davis^[5]和Snieszko^[6]等氏认为,虽然在细菌性烂鳃的鳃上发现有大量粘细菌,但迄今为止,这些菌作为致病菌,仍然缺乏令人信服的证据。

1974年3月15日收到。

* 执笔人: 卢全章、倪达书、葛蕊芳。照相: 何楚华。

在国内,对细菌性烂鳃病的研究还很不够。本所鱼病室过去对此病进行过一些研究,但未能分离到致病菌^[2],其他单位也没有这方面的报道。草鱼细菌性烂鳃病在我国饲养鱼类中,特别是在鱼种饲养阶段,是非常普遍和严重的。但由于过去重点放在肠炎病的研究,而对这种病却没有引起我们足够的重视,以致长期没有把烂鳃致病菌分离出来。由于致病菌没有找到,对有效地防治这种病带来了不少困难。

为了坚决贯彻科研为无产阶级政治服务,急生产之所急,尽快地对危害大、流行广的草鱼细菌性烂鳃病找出有效的防治方法,我们在1972年下半年再次开展了这种病的病原分离工作。经过反复地分离、感染,终于分离到了烂鳃致病粘细菌——鱼害粘球菌(*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, sp. nov.)新种。

二、材料和方法

(一) 材料来源

从本所养鱼池和武汉市东西湖养殖场的发病鱼池中挑选有明显烂鳃症状的三龄草鱼、当年草鱼、当年草鳊杂交种和三龄鳊鱼共八尾,分别进行分离。

(二) 分离方法和培养基的制备

在病鱼的病变部位(鳃丝),取小块组织,放在预先滴在载玻片上的一滴无菌水的边缘,经10—20分钟后移去组织,用接种环蘸水,在平板上划线;或者用接种环直接从病变部位取材于平板上划线,然后将平板放在25℃恒温箱中培养2—3天。根据菌落特征,挑取单个菌落,接到试管斜面上,25℃培养24小时左右,取菌涂片,革兰氏染色、镜检,确定是否已分纯,若不纯则再分离一次。分纯后进行液体培养,开始人工感染试验和其他方面的观测。

1. 分离用的培养基:一般用含养料丰富的培养基和普通培养基、豚豚加血红胨(hemoglobin)、鱼肉浸出液加豚等,都因被其他生长快的细菌盖没而烂鳃菌长不出来,因此分离粘细菌必须用贫营养的培养基。初分离用如下配方的培养基为好:

胰蛋白胨(tryptone)	0.05%
酵母膏	0.05%
牛肉膏	0.02%
醋酸钠	0.02%
琼脂	2.00%

用蒸馏水配, pH7.2—7.4, 高压蒸气灭菌(15磅, 30分钟)。分纯后转接到传种的斜面固体培养基,其成分与上述培养基相同,不同之处仅在于将胰豚增加到0.25—0.5%。

液体培养用的培养基(胰豚培养液):

胰蛋白胨	0.5%
酵母膏	0.05%
牛肉膏	0.02%
醋酸钠	0.02%

用蒸馏水配, pH7.2—7.4, 高压蒸气灭菌(15磅, 30分钟)。

2. 冷冻干燥保存:粘细菌在固体培养基上4—5天后即行衰退;液体培养稍长,但5—

6天后繁殖和毒力都容易停止和减弱。因此,要保持其特性,必须在分纯后立即进行冷冻干燥保存。

(三) 人工感染方法

1. 浸洗感染: 将已分纯的液体培养菌株配成一定浓度, 然后将健康的鱼放入, 浸洗一定时间, 取出养在试验缸中, 以观察发病情况; 另设对照组进行比较。

2. 加菌感染: 在已知水量的养鱼缸中加入一定量的菌液, 使成一定浓度; 放入健康鱼, 观察其发病情况。

3. 腹腔注射感染。

4. 皮下注射感染。

(四) 生化试验^[15]

1. 明胶液化试验: 在胰脏培养液中加入 12% 明胶, pH7.2, 高压蒸气 8 磅 30 分钟灭菌。接种培养 2—3 天后用二氯化汞浇淹平板, 以观察有无液化明胶的区域出现。

2. 酪素水解试验: 基础培养基(上述胰脏培养基作为基础培养基)加 2% 脱脂牛奶。接种培养 2 天后, 观察平板上有无酪素水解的亮斑。

3. 淀粉水解试验: 基础培养基加 0.2% 可溶性淀粉。接种培养 2—3 天后加碘液(革兰氏碘液)于平板上, 检查蓝背境中有无明亮的水解区域。

4. 七叶灵(esculin)水解试验: 培养基含 0.5% 的胰蛋白胨, 0.1% 的七叶灵, 0.05% 的柠檬酸铵铁, 2% 的琼脂。接种培养, 观察 7 天。如发现菌落周围形成一种黑色沉淀物, 则证明有分解七叶灵的能力。

5. 几丁质分解试验: 将含有 0.1% 的胰蛋白胨, 0.5% 的几丁质, 2.0% 的琼脂的培养基盖于无营养琼脂平板上。接菌培养, 观察 7 天。

6. 分解纤维素的试验: 在胰脏培养液上加滤纸条。接种观察 10 天, 看滤纸条有无缺刻或断裂、分解现象。

7. 酪氨酸分解试验: 在胰脏培养液中加 0.5% 的酪氨酸。接种培养观察 2 星期。看悬浮的酪氨酸是否消失。

8. 溶解菌细胞的能力: 将试验菌的培养平板分别用 50 毫升自来水洗下, 内加 2% 的琼脂, 15 磅高压蒸气灭菌 30 分钟, 然后倒平板, 接种粘细菌, 在生长菌落周围观察有无溶菌区域, 观察时间为一星期。

9. 硝酸盐还原试验: 培养基为硝酸钾 0.02%, 蛋白胨 0.5%。试液: 荷氏试液(Hosvay's reagent)。接种培养 24 小时后滴荷氏甲、乙试液各数滴。阳性者立即或于 10 分钟内显红色。

10. 靛基质试验: 1% 的胰蛋白胨水。试液: 欧氏试液。接种培养 2 天后先加乙醚数滴, 摇动之, 乙醚浮于上层, 再沿管壁滴加欧氏试液约 0.5 毫升。阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

11. 硫化氢试验: 1% 的胰蛋白胨水, 接种培养 2—4 天, 然后用醋酸铅粉加入试管中进行观察。硫化氢遇到铅盐生成黑色沉淀。

12. 枸橼酸盐利用试验: 用柯萨尔枸橼酸培养基, 接种培养, 观察 7 天。

13. 过氧化氢酶试验: 取胰脏斜面培养物一环与 2% 的过氧化氢混合, 观察其反

应。

14. 葡萄糖利用试验：基础培养基加 1% 的葡萄糖，0.0015% 的溴麝香草酚蓝。

三、步骤和结果

(一) 菌株分离和人工感染

1972 年 8 月至 11 月，先后从 6 尾烂鳃的草鱼和 1 尾烂鳃的草鲮杂交种分到 17 株，1973 年 3 月又在 1 尾具有明显烂鳃症状的鳊鱼鳃上分离到 2 株，共 19 株粘细菌。经人工浸洗感染（在 1.5 亿/毫升浓度的菌液中浸洗 30 分钟），所分离的大多数粘细菌都有不同程度的致病力，而属于真细菌类型的菌株，浸洗感染都没有致病力（见表 1 和表 2）。

表 1 1 龄草鱼烂鳃粘细菌人工(浸洗)感染试验

菌号	试验日期	试 验 鱼			水温(℃)	感染后一周内鱼体病变记录	感染死亡率(%)
		总尾数	发病尾数	未发病尾数			
G ₁	1973. 8. 29	3	1	2	27	4 天后死亡 1 尾，鳃丝边缘稍有些烂	33
	1973. 9. 6	5	1	4	26	4 天后死 1 尾，鳃丝边缘腐烂	20
G ₂	1972. 9. 2	4	3	1	27	13、56、58 小时各死 1 尾，烂鳃	75
	1972. 9. 18	10	7	3	25—26	19 小时死 2 尾，22、25、34、48、94 小时各死 1 尾，均为烂鳃	70
	1972. 9. 19	10	2	8	25—26	51、62 小时各死 1 尾，烂鳃	20
	1972. 9. 21	5	3	2	22—26	15 小时死 2 尾，20 小时死 1 尾，均为烂鳃	60
G ₃	1972. 9. 2	4	4	0	27	10 小时死 1 尾、20 小时死 2 尾，31 小时死 1 尾，均为烂鳃	100
G ₄	1972. 9. 2	4	4	0	27	9、10 小时各死 1 尾，13 小时死 2 尾，均为烂鳃	100
	1972. 9. 19	5	5	0	25—26	19 小时死 3 尾，22 小时死 1 尾，51 小时死 1 尾，均为烂鳃	100
	1972. 9. 21	5	5	0	25—26	10 小时死 3 尾，11 小时死 1 尾，11 小时半死 1 尾，均为烂鳃	100
	1972. 10. 12	5	5	0	22	20 小时 5 尾全死，均为烂鳃	100
G ₅	1972. 9. 2	4	0	4	27	正 常	0
G ₆	1972. 10. 12	5	0	5	22	正 常	0
G ₉	1972. 10. 12	5	0	5	22	正 常	0
G ₁₀	1972. 10. 12	5	0	5	22	正 常	0

注：1. G₄、G₉、G₁₀ 系真细菌；2. 以上试验每次均有对照组，对照组鱼均正常。

经人工浸洗感染试验，发现 G₄ 菌株的致病力比较强，故对 G₄ 菌株作了进一步的研究。以下针对 G₄ 菌株加以叙述：

用 G₄ 菌株对健康的草、鲢、鳊、团头鲂和草鲮杂交鱼种进行了浸洗感染，结果见表 3。从表 3 中可以看出 G₄ 菌株能使上列健康鱼种致病，并显示出烂鳃症状。但是，不同的鱼在症状表现上则有些差异，草鱼、团头鲂和草鲮杂交种鳃丝腐烂迅速和明显；鲢和鳊表现鳃丝充血，粘液多，鳃丝腐烂的速度则比较缓慢。

G₄ 菌株对野杂鱼(如罗汉鱼)同样有致病力。罗汉鱼感染后同样显示烂鳃症状。其他

表 2 草鱼及草鳊杂种烂鳃的粘细菌人工感染试验

菌号	试 验 鱼		发病尾数	未发病尾数	感染后一周内鱼体病变记录
	类别	尾数			
G ₁₅	草鳊杂种	5	5	0	22小时半死 1 尾, 31小时死 3 尾, 39小时死 1 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	39 小时死 5 尾, 呈点块状烂鳃
G ₁₆	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 4 尾, 39 小时死 1 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	39 小时死 5 尾, 均为点块状烂鳃
G ₁₇	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 4 尾, 39 小时死 1 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	39 小时死 5 尾, 均为点块状烂鳃
G ₁₈	草鳊杂种	5	5	0	42 小时死 3 尾, 44、63 小时各死 1 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	0	5	全部正常
G ₁₉	草鳊杂种	5	5	0	39 小时死 3 尾, 42 小时死 2 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	3	2	55 小时死 2 尾, 79 小时死 1 尾, 均为点块状烂鳃, 其余正常
G ₂₀	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 3 尾, 29 小时死 2 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	39 小时死 5 尾, 均为点块状烂鳃
G ₂₁	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 5 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	31 小时死 1 尾, 39 小时死 4 尾, 均为点块状烂鳃
G ₂₂	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 5 尾, 均为点块状烂鳃
	草 鱼	5	5	0	31 小时死 4 尾, 39 小时死 1 尾, 均为点块状烂鳃
对 照	草鳊杂种	5	0	5	均 正 常
	草 鱼	5	0	5	

注：试验从 1972 年 11 月 21 日开始, 观察一周: 水温为 13—15℃; 试验和对照均为 1 龄鱼。

表 3 G₄ 菌株对不同鱼的浸洗感染试验

菌号	试 验 鱼		发病尾数	未发病尾数	感染后一周内鱼体病变记录	感染死亡率(%)
	类别	尾数				
G ₄ 菌株	草 鱼	5	5	0	39 小时死 2 尾, 40 小时死 1 尾, 63 小时死 2 尾, 均有明显烂鳃	100
	草鳊杂种	5	5	0	31 小时死 1 尾, 39、40 小时各死 2 尾, 均有明显烂鳃	100
	团 头 鲂	5	5	0	12 小时死 4 尾, 22 小时死 1 尾, 鳃严重腐烂, 多粘液	100
	鳊 鱼	5	5	0	31 小时死 1 尾, 39 小时死 4 尾, 鳃丝多粘液, 发肿, 烂	100
	鲢 鱼	5	5	0	12 小时死 5 尾, 鳃丝多粘液, 肿胀, 边缘腐烂	100
对 照	以 上 五 种 鱼	各 5	0	25	全部正常	0

注：试验从 1972 年 11 月 21 日开始, 观察一周; 试验均为 1 龄鱼; 水温为 15℃。

如蝌蚪也能被 G_4 菌株感染而死亡。

用 G_4 菌株作腹腔注射试验：用 1 龄草鱼鱼种，注射 G_4 菌株悬液，注射剂量为 3 号比浊管 (McF) 0.5 毫升，即 4.5 亿菌，能使草鱼在 21 小时内全部死亡。其症状表现为：肛门红肿，腹水很多，全肠紫红，腹部肌肉充血，与典型的草鱼肠炎病几乎没有差别，但鳃瓣则正常，无丝毫烂鳃现象 (见表 4)。

用 G_4 菌株作皮下注射试验：用 1 龄草鱼鱼种，注射剂量为 3 号比浊管 0.2 毫升 (即 1.8 亿菌)，能使草鱼出现慢性溃烂。其过程为：从注射部位开始，由外向里发展，表皮脱落，鳞片继之，肌肉溃烂，烂成一个圆形窟窿，但鱼并不马上死亡，而是慢慢地死去 (见表 4)。

表 4 G_4 菌株对 1 龄草鱼皮下和腹腔注射试验

菌号	试验尾数	发病尾数	未发病尾数	注 射 菌 液			注射后一周内鱼体病变记录
				浓 度	部 位	菌 量 (毫升)	
G_4	10	10	0	9亿/毫升	背 部 皮 下 注 射	0.2	10 尾鱼注射部位肌肉均腐烂成一个洞，表皮脱落，露出肌肉，其中 2 尾严重致死；鳃均正常
	10	10	0	9亿/毫升	腹 腔	0.5	21 小时 10 尾均死，肛门红肿，腹部肌肉充血，多腹水，全肠发紫，鳃正常
对照	10	0	10	无 培 养 基	皮 下	0.2	均无病变
	10	0	10		腹 腔	0.5	

注：试验从 1972 年 9 月 16 日开始，观察一周；试验期间水温为 25℃。

用 G_4 菌株感染草、鲢、鲤夏花试验：一般症状与 1 龄鱼种的表现有所不同，它不仅能使试验鱼出现烂鳃，而且能使躯体出现白皮、白嘴、白头等症状。每毫升水中只要 0.005 亿 G_4 菌就能使 0.5—1 市寸的草、鲤、鲢夏花在 24 小时左右，46 尾试验鱼全部死亡 (见表 5)。

表 5 G_4 菌株对草鲢鲤夏花感染试验

试验日期	试 验 鱼 数			发 病 鱼 数			水 中 菌 液 浓 度	病 症
	草	鲢	鲤	草	鲢	鲤		
1973. 5.29	5	0	5	5	0	5	0.005亿/毫升	18小时内死完，有烂鳃、白皮、白头、白嘴症状
1973. 5.30	5	0	0	5	0	0	”	33小时内死光，症状同上
1973. 6.25	20	5	6	20	5	6	”	24小时内死光，症状同上

注：试验鱼均为 0.5—1.0 市寸大小；试验期间水温为 24—26℃。

在人工感染的烂鳃病灶中，取粘液进行显微镜检查，可以看到许多群集的粘细菌；在腹腔注射感染的腹水中也同样存在着许多粘细菌。我们从人工感染的病鱼鳃部和腹水中又重新分离到粘细菌 (从鳃部分离到 G_{4-1} …… G_{4-5} 五个菌株；从腹水中分离到 G_{4-6} …… G_{4-11} 六个菌株)。将这些重新分离到的菌株，再进行浸洗感染，同样能使草鱼致病，并显示出烂鳃症状 (见表 6)。

我们分离到的 G_4 菌株，经多次人工感染和反复分离与再感染，均能使草鱼致病死亡。

表 6 11 株再分离菌株对 1 龄草鱼的浸洗感染试验

菌 号	试 鱼 尾 数	发病尾数	未 发 病 尾 数	感染死亡率 (%)	感 染 后 一 周 内 鱼 体 病 变 记 录
G ₄₋₁	5	5	0	100	10—12 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₂	5	5	0	100	”
G ₄₋₃	5	5	0	100	”
G ₄₋₄	5	5	0	100	”
G ₄₋₅	5	5	0	100	10—18 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₆	5	5	0	100	10—15 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₇	5	5	0	100	13—18 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₈	5	5	0	100	10—12 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₉	5	5	0	100	17 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₁₀	5	5	0	100	20—24 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
G ₄₋₁₁	5	5	0	100	34 小时死 5 尾, 均有烂鳃症状
对 照	5	0	5	0	均正常

注: G₄₋₁—G₄₋₅ 系从 G₄ 菌株感染的发病鱼的鳃上分离; G₄₋₆—G₄₋₁₁ 系从 G₄ 菌株腹腔注射感染后的病鱼腹水中分离; 试验从 1972 年 9 月 23 日开始, 观察一周; 试验期间水温 22—23℃。

其症状主要表现在鳃瓣上: 鳃丝末端膨大, 弯曲、发白, 鳃小片浮肿、混乱、腐烂, 逐渐向鳃丝基部和左右鳃丝蔓延, 鳃丝软骨外露; 坏死细胞、粘细菌与粘液以及水中泥尘杂物等胶混一起, 形成不规则的团块, 粘附于腐烂鳃丝的周围, 与天然患烂鳃病的症状基本一致。夏花鱼种除了鳃丝易感染外, 体表皮肤也很容易感染, 这大概由于皮肤比较幼嫩之故。根据这些事实, 我们认为 G₄ 菌是草鱼细菌性烂鳃病的致病菌。

(二) 形态特征

1. 菌体形态: 草鱼粘细菌 G₄ 菌株的形态与已知的柱形粒球粘菌 (*Chondrococcus columnaris*) 和柱形纤维粘菌 (*Cytophaga columnaris*) 基本上是相似的。菌体细长、柔软而易弯曲, 粗细基本上一致, 约 0.3 微米左右; 两端钝圆, 一般稍弯, 有时弯成半圆形、圆形、U 形、V 形、Y 形等, 但较短的菌体通常是直的 (图版 I. 1)。长短很不一致, 体长 2—24 微米, 有的长达 37 微米。革兰氏染色阴性。用横分裂繁殖, 通常横分裂成两个差不多相等长度的个体。在分裂前, 菌体往往在中点弯折, 形成 V 形结构。新分裂但未完全离开的两个菌体, 有时能看到有纤线彼此联系, 如用甲基蓝或中性红活体染色, 这纤线显出淡蓝色或粉红的颜色, 表明它是分泌的粘液, 而不是细胞的组成结构。

菌体从胰液溶液中挑出, 放在载玻片上观察, 能看到缓慢的滑行, 如果加上一滴无菌水或清水后, 运动就非常活跃。菌体无鞭毛, 是按反冲原理运动, 常见的有以下两种方式: 一是象鳗鱼一样滑行运动, 通常是向一个方向, 如前进遇到障碍, 则后端变为前端作相反方向运动; 一是摇晃摆动, 有时忽然垂直成一发亮圆点, 然后又慢慢横卧, 周而复始, 形成旋转式的运动。我们没有具体测定 G₄ 菌株的滑行速度, 但根据 Garnjobst^[10] 和 Stanier^[17] 等氏报告, 粘细菌的滑行速度每分钟达 60—150 微米。

2. 菌落形态: 我们从草鱼烂鳃病灶中分离到的 G₄ 菌株, 在胰液琼脂平板上生长良好, 25℃ 培养 2—3 天, 就出现稀薄的、平铺在琼脂表面上呈扩散型的菌落, 边缘不整齐, 假根状, 中央较厚, 颗粒状。菌落大小不一, 一般直径在 3 毫米上下 (图版 I. 2)。在解剖

镜下观察,单个菌落的轮廓象一朵菊花,中央较厚,边缘象树根一样向四周扩散(图版 I. 3、4)。菌落最初与琼脂的颜色相似,粗看不易发现,36 小时后,渐现淡黄色,以后随培养日龄的增加而菌落扩大,菌层增厚,颜色变深黄,一般在 5 天后就不再生长。

分纯的 G_4 菌株,也能在普通培养基上生长。

3. 子实体的形成: 在胰酪琼脂平板上接种液体培养的 G_4 菌株,如果接种稀疏,在室温 21—25℃ 条件下,一般在 48 小时左右(恒温 29℃,36 小时或更早些),在菌落的偏中央地方,有时甚至看不到菌落,长出单个的子实体,肉眼看,为一个个单独的淡黄白色小球,如用解剖镜观察则为圆锥体,基部宽大,无收缩之柄,表面光滑,折光较强,突出于菌落之中,亦有长在菌落的边缘。随着培养时间延长,子实体逐渐长大,有的与近邻挤成一团(图版 II. 7),有的 3—5 个联成一行(图版 II. 8)。在一个单独的菌落中,有 7—12 个大小不等的子实体(图版 II. 6)。子实体的直径为 130—700 微米。培养 4 天后,在灯光下照视或在解剖镜下观察,子实体金光闪闪,突出在花朵状的菌落上。以后保持不长不变状态约 3—4 天,接着颜色就逐渐变淡而衰亡。

同一批冷冻干燥保存的 G_4 菌株,在同样的接种和培养条件下,产生子实体的结果是参差不一的。凡是菌落稀少的平板上,往往生长较多的子实体(图版 II. 8)。相反,菌落密集者多数不长子实体或长少数单个的子实体(图版 II. 5)。更有趣的是,在长子实体的同一平板上,有的菌落始终不长子实体。

我们在试验过程中,发现液体试管培养 4 天后,在液、气交界的试管壁上(界面)长出与平板一样形态的子实体,以后在浮于液面的菌膜上也有发现。这种情况,在过去的文献中还未报道。必须指出,这种子实体只着生在液、气交界的液面上,而在液体中则尚未发现。

为了证实上述的子实体是否为真正的子实体,我们做了小孢子(microcyst)¹⁾的涂片染色和发芽试验。图版 III. 9 为子实体压碎后涂片,用 Zenker's 固定液固定和碱性复红染色的照片。从照片上看,小孢子的大小是不一致的,大致可分为大、中、小三种类型,直径 0.8—2 微米,都有很强的折光性,表明孢膜的结构比较厚。由于粘细菌的小孢子形成过程简单,系由菌体缩短而成^[6],同时由于菌体有长有短,故缩成的小孢子就有大小不同之别,这是可以理解的。

我们采用了直接将子实体放入胰酪溶液中培养的方法,以观察能否从子实体中发芽长出营养细胞。这样培养,难免会带进许多包围在子实体周围的粘细菌,干扰正确的判断,因此我们反复做了三次试验,其结果如下:

(1) 9 月 14 日上午 9 时,将 9 月 9 日培养在平板上的 G_4 菌株长出的子实体逐个切下,尽量剔除其外围的粘细菌,然后放入胰酪培养液(两套)。15 日上午 9 时观察,子实体比原接入时涨大,体壁失去光泽,变得疏松,菌体长出。15 日 17 时从胰酪溶液中取出放在载玻片上,用显微镜观察,一个子实体长出很多粘细菌(图版 III. 10),另一个子实体壁已破,大部分粘细菌已离开,仅留少数残余在破口之外(图版 III. 11)。

(2) 9 月 15 日 17 时,从 9 月 12 日接种于试管斜面上的 G_4 菌株所长出的子实体又

1) microcyst 字意应译称小孢囊,但实际上是小的孢子,故改译为小孢子,下同。

切下放入胰液溶液中培养(两套),经 17 小时后观察,子实体略有膨大,30 小时左右已长出很多菌体,42 小时观察,圆形的子实体已膨大延伸为椭圆形,64 小时子实体外壳仅留痕迹,溶液中长满粘细菌。

(3) 9 月 17 日 21 小时,将 15 日接种在胰液琼脂平板上长出的 G_4 菌株子实体挖出,转接于胰液溶液中(两套)。12 小时后观察,原来折光很强、体壁很光滑的子实体,个个都变疏松,失去光泽;24 小时,子实体一边长出很多粘细菌;33 小时,液面和皿底长出菜子至绿豆大小的菌团;45 小时,有些菌团直径达 1.1 厘米,子实体仅留模糊的空壳;60 小时,观察子实体空壳有的已溶化,有的仅留痕迹,此时大约已到生长的高峰;往后开始衰退,到 168 小时,所有菌团都溶化消失,仅于皿底残留着不少粘液碎片。

以上三次试验都是在 25℃ 左右进行的,观察结果可归纳为如下四点:

(i) 用子实体培养,仔细观察其变化,虽有营养菌体的干扰,还是可以看到其转化的过程;

(ii) 子实体接入胰液溶液中培养 30 小时,大多数小孢子已转化为营养细胞;

(iii) 培养 60 小时左右,子实体壁破碎或溶化,仅留痕迹,同时营养细胞也达到繁殖生长的高峰;

(iv) 如不再转接而留在原溶液中培养时,约 72 小时以后就到了衰退死亡期。

4. 胰液液体培养特性:

(1) 胰液液体培养: 将液体培养的 G_4 菌株接种于胰液液体中,25℃ 培养 2 天,可见生长丰盛,液体混浊,表面覆盖一层淡黄色菌膜。开始是在液体表面贴近管壁形成花边式的环,以后迅速繁殖,逐渐扩大,覆盖液面,并随着时间的增长,菌膜逐渐变厚,颜色变深,且不易破碎。在液面与空气交界的管壁上(第 4 天以后)出现颜色金黄、结构致密、折光较强的锥形子实体,第 5 天在菌膜上也有出现。另一方面在液下管壁上常粘附着圆形的菌落,并散发出网状的小菌团,象大团藻状向四周扩布(图版 III. 12; 图版 IV. 14),管底也有细胞堆积,到第 5 天后更多。此时液体已由浑浊而转清。培养到第 8、9 天,菌体衰亡,通常不能再接活。

从培养液中取菌涂片,连续进行显微镜观察,可以看到菌体形态有如下变化: 12—24 小时,菌体粗,比较短,运动活跃; 36—60 小时,生长旺盛,分裂快,菌体比较长,有许多呈弯曲,有的还有假分枝,短的菌体相对的少,运动还是很活跃; 72—96 小时,菌体长短悬殊,有长丝状、中等长和很短的; 此后,出现许多圆球形的球质体(spheroblasts)^[19], 108—120 小时,长菌体逐渐减少,而球质体则逐渐变多,再后则杆状菌体极少,球质体占绝对优势(图版 IV. 13),终至衰亡。

(2) “柱子”形成(column formation): 当从固体培养基上刮取少许 G_4 菌苔接入试管或平皿胰液溶液中进行培养,由于 G_4 菌有群集的习性,在液体中,菌体一般喜欢相互堆聚在一起,形成星状、球形和草堆形的菌团。在 12—24 小时观察,凡较大的菌团,由于其在繁殖时的运动特性,形成各式各样的“柱子”形态,此时液体还比较清澈。24 小时以后,这些菌团从四周向外产生乳头状突起,并逐渐延长成“柱子”(图 1; 图版 V. 16—18)。通常在柱子的末端萌发出圆球形菌团,菌团周围布满许多细长而摇摆着的菌体,“柱子”增大后又产生乳头状突起,并延长成新的“柱子”,从而形成一种分枝复杂的结构。在溶液中加入

0.5—0.8ppm 的代森铵 (dithane stainless) 或 0.6—0.8ppm 代森锌 (zineb) 时, 这种“柱子”的形成更为明显和复杂 (图 1; 图版 V. 17、18)。有些团块状的菌团从四周向外抛出圆球形子菌团, 使母菌团周围散满了不同大小的圆球形和不规则形的子菌团, 在这些子菌团之间布满着单个营养菌体 (图版 IV. 14、15)。菌团继续不断地向外散发, 因之, 菌团逐渐变

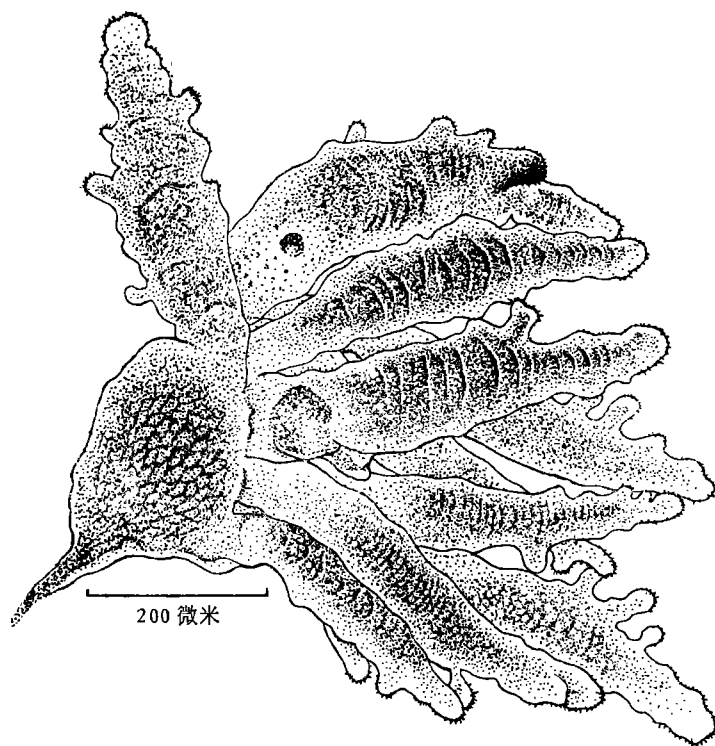


图 1 G₄ 菌株在胰液溶液 (含 0.8 ppm 的代森锌) 中形成“柱子”

小, 离“母菌团”越远的则越小, 最后成为更小的菌团或菌体分散在溶液中, 这时培养液也就由清变得比较混浊。以后 (144—192 小时, 即 6—8 天), 分散在溶液中的菌体或小的菌团逐渐衰亡而沉于管底。同时, 另外一些不向四周散发的子菌团的各式各样的“柱子”和菌团都显得萎缩、软弱, 有的则仅留骷髅的样子。显微镜观察, 绝大多数菌体收缩成圆球形或椭圆形的球质体, 这时水溶液又从浊变清, 表示菌体已衰亡。以上是整个“柱子”形成和衰亡的过程, 经历了由分散到集群 (菌团和“柱子”), 然后又由集群到分散, 最后缩成球质体而死亡。我们曾用 Ordal 和 Rucker 氏^[9]的方法以及 Borg 氏^[4]的方法进行“柱子”形成培养, 所得结果与上述培养方法完全一致, 所不同的是没有发现 Ordal 和 Rucker 氏所说的“柱子”能转化为子实体的现象。

(三) 生长条件

1. 酸碱度: pH6.5—7.5 生长良好, pH8 生长较差, pH8.5 以上和 pH6 以下则不生长。

2. 温度和毒力: 最适温度 25℃, 生长良好, 毒力强; 18℃, 生长较慢, 毒力强; 33℃, 生长良好, 但毒力较差; 40℃, 生长慢, 毒力很低; 4℃, 不生长; 65℃, 5 分钟即致死。

3. 耐盐能力: 培养基中含 0.7% 以上的食盐, 就抑制 G₄ 菌株的生长 (见表 7)。

表 7 食盐对 G₄ 菌株的生长影响

观察时间 食盐浓度 (%)						
	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
第一天	—	—	—	—	—	—
第二天	+	+	—	—	—	—
第四天	+	+	—	—	—	—

— 表示不生长， + 表示生长。

4. 兼性好气生长：摇床培养生长旺盛，在厌气条件下也能生长，但生长很慢，繁殖少。

(四) 生化特性

采用 Pacha 和 Porter 氏^[15] 1968 年的方法，对已分离到的 12 个菌株进行了有关的生化测定。测定的结果见表 8。为了便于比较和参考，也列了 Pacha 和 Porter 氏对柱形粒球粘菌和嗜冷纤维粘菌 (*Cytophaga psychrophila*) 两种菌的生化特性的测定结果。

表 8 烂鳃粘细菌菌株的生化测定

结 果 试 验 名 称		菌 株												柱形粒球粘菌	嗜冷纤维粘菌
		G ₁	G ₂	G ₄	G ₄₋₁	G ₁₅	G ₁₆	G ₁₇	G ₁₈	G ₁₉	G ₂₀	G ₂₁	G ₂₂		
分解酪素		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
分解明胶		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
分解七叶灵		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
分解纤维素		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
硝酸盐还原		—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—
H ₂ S 试验		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
分解酪氨酸		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
利用枸橼酸盐		—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
吲哚试验		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
过氧化氢酶试验		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
溶解细菌死胞	① 64-16-35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	② 56-12-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	③ 八叠球菌	—	—	—											
分解几丁质		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
分解淀粉		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
分解葡萄糖		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：+ 表示阳性， — 表示阴性；柱形粒球粘菌和嗜冷纤维粘菌是 Pacha 和 Porter 氏的试验结果，列入表中作参考。

从表 8 所列的结果看来，我们分离到的 12 个菌株，基本上是相同的，同时与柱形粒球粘菌和嗜冷纤维粘菌也很相似。

(五) 草鱼烂鳃粘细菌的分类

综合上述 G₄ 菌株的形态特征、运动方式、生化特性和产生子实体等特点，根据 Bergey 氏细菌鉴定手册第七版的分类原则^[18] 来衡量，草鱼烂鳃致病菌 G₄ 菌株显然应隶属于粘细菌目 (Myxobacterales)，粘球菌科 (Myxococcaceae)。因为子实体的粘膜较薄，易

于消解 (deliquescent), 故应属于粘球菌属 (*Myxococcus*)。

根据文献报道^[18], 属于粘球菌属的共有 6 种, 其中 5 种就其子实体以及菌体形态、大小、颜色等与本种相比是显然不同的, 而与 Beebe 氏^[11] 1941 年描述的黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) 则比较相似, 特别是子实体的着生形式及其颜色。但是, 黄色粘球菌的子实体有时有柄, 菌体粗而短 (0.5—1.0 微米 $\times$ 4—10 微米) 平均 0.75×6.0 微米, 生长在干牛粪上, 这是与我们分离到的 G₄ 菌株完全不同的。因此定名为鱼害粘球菌, 新种 (*Myxococcus piscicola* Lu, Nie & Ko, sp. nov.)。

四、讨 论

绝大多数粘细菌生活在土壤和草食动物的粪便中^[16,18]。对鱼类能致病的粘细菌, 文献上共记载了 3 种^[19]。一种是 Ordal 和 Rucker 氏^[9] 于 1944 年从蓝背鲑 (*Oncorhynchus nerka*) 的皮肤病灶中分离到能产生子实体的粘细菌, 定名为柱形粒球粘菌 (*Chondrococcus columnaris* (Davis) Ordal & Rucker); 一种是 Garnjobst 氏^[10] 于 1945 年从牛头鱼 (*Ameiurus nebulosus*) 皮肤病灶中分离到不产生子实体的粘细菌, 定名为柱形纤维粘菌 [*Cytophaga columnaris* (Davis) Garnjobst]; 第三种是 Borg 氏^[14] 于 1948, 1960 年从年轻的麻哈鱼冷水病(尾柄病)的病灶中分离到不产生子实体的粘细菌, 定名为嗜冷纤维粘菌 [*Cytophaga psychrophila* Borg]。这种菌因为生态特殊, 流行不广, 多数鱼病细菌学家认为是可以确认的物种。关于第一第二两种菌, 则有较大的争论。有人认为柱形纤维粘菌, 它除了不产生子实体外, 其他形态、生化特性和致病症状等都与柱形粒球粘菌相同, 而且二者都是对 Davis 氏 1922 年所描述的柱形芽孢杆菌 (*Bacillus columnaris*) 的校正学名。因此 Borg 氏^[14], Stanier 氏^[18], Bullock 氏^[20] 等认为 Garnjobst 氏的菌株是失去产生子实体能力的柱形粒球粘菌, 因为这种菌在长期培养下往往失去产生子实体能力, 故应该算是同一种, 根据优先律应用柱形粒球粘菌这一学名。Davis 氏^[5] 1953 年认为 Garnjobst 氏的菌与 Ordal 和 Rucker 氏的菌很相似, 但不认为是同种, 所以还是支持 Garnjobst 氏的意见, 用柱形纤维粘菌这个学名。Pacha 和 Ordal 氏^[19] 1970 年从生化组成的角度来衡量柱形粒球粘菌的鸟嘌呤与胞嘧啶的比例 (guanine—cytosine ratio), 与粒球粘菌属标准种珊瑚粒球粘菌 (*Chondrococcus corallodides*) 比较, 则大不相同, 从而怀疑它是否确隶于粒球粘菌属, 需要进一步研究澄清。Pacha 和 Porter 氏 1968 年从淡水鱼类皮肤上分离到不少菌株都属于纤维粘菌属类型, 这表明淡水鱼类皮肤上确实有纤维粘菌的存在, Borg 氏, Bullock 氏等的上述论断, 看来是难于成立的。特别值得注意的是, Ordal 和 Rucker 氏分离出来的柱形粒球粘菌有两种子实体, 一种是从哥伦比亚河中患有显著粘细菌病灶的 7 种鱼的体表和肾脏分离出来的菌株, 它在固体培养基上能长出圆球形的子实体。但是, 他们说: “产生这种子实体的菌株与其在勒汾卫司孵化场所分离的菌株在固体培养基上生长有些区别, 特别有趣的是出现确确实实的子实体”, “(而后者在培养) 几天以后, 菌落呈现出不规则隆起的疣相, 类似没有成熟的子实体” (“After a few days, the colonies assumed a warty appearance with irregular elevated areas resembling immature fruiting bodies”)。从他们这些描述来分析, 勒汾卫司孵化场所分离的菌株, 显然在固体培养基上是不产生子实体的, 而这种菌株恰是他们定种的主要依据。另方面这种菌是在胰脏溶液中培养“柱子”形成柱形体以

后,由它转化为柱形的子实体。他们虽确信其为子实体,但没有作具体的发芽验证,所以自相矛盾地说:“在水溶液中产生子实体是一新发现,但没有考虑它来决定粘细菌的系统分类位置”,而且进一步推测这种子实体很可能与 Stepp 和 Bortels 氏^[21]以及 Stanier 氏^[17]对不产生子实体的粘细菌在水溶液培养中形成星状结构是类似的现象。

根据他们以上的论述和我们对鱼害粘球菌的实验观察,说明他们认为液体培养中的柱形体能转化为子实体和小孢子的说法均是不可能的。

然而, Ordal 和 Rucker 氏在分类定种时却用哥伦比亚河的菌株之子实体戴到勒汾卫司孵化场的菌株头上而命名为柱形粒球粘菌。因此我们认为柱形粒球粘菌这个种应是 Garnjobst 氏的柱形纤维粘菌的同物异名。

至于 Ordal 和 Rucker 氏从哥伦比亚河中 7 种鱼上分离出来产生子实体的菌株,它应属何种,却没有命名。我们因为没有具体资料,未便代之命名。

Stanier 氏 1957 年在 Bergey's^[18] 细菌鉴定手册第七版中将 Ordal 和 Rucker 氏描述的“柱子”形成结构——柱形体,作为柱形粒球粘菌的子实体,这显然是由于 Ordal 和 Rucker 氏确信其为子实体而造成的,同时也表明 Stanier 氏没有分析验证的错误。若林久嗣和江草周三^[12]从泥鳅鳃病灶上分离到的粘细菌,定名为柱形粒球粘菌,其所称的子实体和小孢子,显然不是真正的子实体和小孢子。随后,若林久嗣、吉良桂子和江草周三^[13]又从池养鳊鳃病灶上分离到柱形粒球粘菌,我们认为也有同样的问题。

我们用各种方法(包括 Ordal 和 Rucker 氏的鳞片诱导以及 Borg 氏的灭菌小块鱼组织加无菌水,接种平板上新长出的菌苔等方法)对 G₄ 菌株进行“柱子”形成的试验中,反复看到如图版 IV. 15; 图版 V. 16—18 所示的“柱子”,经 6—8 天,在原液中培养后逐渐萎缩消失或仅留骷髅状的残迹。因此,我们认为这不是子实体,而是鱼类寄生粘细菌在人工培养液中生长、繁殖、运动和衰老死亡过程中一种特殊形态。

子实体是分类鉴定粘细菌的主要标准^[18],但从鱼害粘球菌的培养结果来看,是非常参差不齐的,其规律尚难掌握,故对新分离到的菌株必须多培养,多观察才能决定其有无。

鱼类寄生粘细菌的寄生部位有没有专一性,也是急待研究解决的问题,文献上对这个问题还存在许多混乱。Davis 氏^[8]说柱形纤维粘菌既能侵袭皮肤又能感染鳃瓣, Ordal 和 Rucker 氏则在鳃上只分离到纤维粘菌。我们在鱼苗到夏花阶段,从草鱼的白头白嘴病标本上分离到了致病的粘细菌,但其形态、生化特性和子实体有无,尚待进行研究。

鱼害粘球菌的毒力很容易衰退,最初毒力很强,往往数次转接以后就没有毒力了。因此,如何保持其毒力,也是防治工作中必须解决的问题。

参 考 文 献

- [1] 中国淡水养鱼经验总结委员会, 1973. 中国淡水鱼类养殖学(第二版), 第十二章. 科学出版社。
- [2] 王德铭, 1958. 鲢、青鱼烂鳃及赤皮病致病菌的研究. 水生生物学集刊, (1): 9—25.
- [3] Davis, H. S., 1926. A new gill diseases of trout. *Dan. Am. Fish. Soc.*, **56**:156—157.
- [4] Davis, H. S., 1927. Further observations on the gill diseases of trout. *Tran. Am. Fish. Soc.*, **57**:210—212.
- [5] Davis, H. S., 1953. Culture and disease of game fish. University of California Press, Berkeley, 262—264.
- [6] Snieszko, S. F., 1972. Progress in fish pathology in this century. *Symp. Zool. Soc. Lond.*

- (30):1—15.
- [7] Davis, H. S., 1922. A new bacterial disease of freshwater fish. *Bull. Bur. Fish., Wash.* 38: 261—280.
 - [8] Davis, H. S., 1947. *Cytophaga columnaris* as a cause of fish epidemic. *Tran. Amer. Fish. Soc.* 77:102—104.
 - [9] Ordal, E. J. and R. R. Rucker, 1944. Pathogenic Myxobacteria. *Proceeding of the society for experimental biology and medicine*, 56(1):15—18.
 - [10] Garnjobst, L., 1945. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: A Myxobacterium pathogenic to fish. *J. Bact.* 49:113—128.
 - [11] Beebe, J. M., 1941. The morphology and Cytology of *Myxococcus xanthus* N. sp. *Ibid.*, 42: 193—223.
 - [12] Wakabayashi, H. and Syuzo Egusa, 1966. Characteristics of a myxobacterium, *Chondrococcus columnaris*, isolated from diseased Loaches. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 32:1015—1021.
 - [13] Wakabayashi, H., K. Kira, and Syuzo Egusa, 1970. Studies on Columnaris disease of Pond-cultured Eels—I Characteristics and pathogenicity of *Chondrococcus columnaris* isolated from pond cultured Eels. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 36(2):147—155.
 - [14] Borg, A. F., 1960. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Wildlife disease* 8:1—85, 2 microcards.
 - [15] Pacha, R. E. and Sook Porter, 1968. Characteristics of Myxobacteria isolated from the surface of freshwater fish. *App. Micro.*, 16(12):1901—1906.
 - [16] Dworkin, M., 1966. Biology of the myxobacteria. *Annual. Rev. Micro.* 20:75—106.
 - [17] Stanier, R. Y., 1942. *Bacteriol. Rev.*, 6:143—196.
 - [18] Breed, R. S., S. G. D. Murray and N. R. Smith, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. Bailliere, Tindall & Cox, Ltd. London.
 - [19] Pacha, R. E. and E. J. Ordal, 1970. Myxobacterial diseases of Salmonids. A Symposium on diseases of Fishes and Shellfish. *Am. Fish. Soc. Special Pub.*, (5):243—257.
 - [20] Bullock, G. L., 1970. Advance in Knowledge concerning Bacteria pathogenic to fishes. 1954—1968, *Ibid.*, (5):231—242.
 - [21] Stepp, C. and H. Bortals, 1934. *Zent. Bakt. Parasitenk.*, 2(90):28.

STUDIES ON THE GILL DISEASES OF THE GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLULS*)

I. ISOLATION OF A MYXOBACTERIAL PATHOGEN

LABORATORY OF FISH DISEASE, INSTITUTE OF HYDROBIOLOGY, HUPEI

ABSTRACT

According to the present knowledge, gill diseases of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) can be broadly arranged under three categories, viz., diseases caused by parasites, by branchiomycosis, and by bacterial infections. Among these, bacterial infections are the most serious menace to grass carp culture and cause much of the mortality among both fingerlings and yearlings. Unfortunately, gill disease has hitherto received little attention since there has been a prevailing belief that the high mortality is due to intestinal infections. Casual attempts to isolate the pathogen of gill-rot were unsuccessful either in our Institute or in other laboratories of this country. As a result of this situation, no effective measures were adopted to halt the course of the infection and this rendered many hatcheries to sustain considerable

mortalities year after year.

In the late summer of 1972, we restarted the isolation of this particular agent during the outbreak of an epizootic in grass carp fingerlings at the East & West Lake Hatchery and our fish ponds in Wuhan, Hupei Province. Experiments on infection and transmission were carried out, and the disease commonly referred to as gill-rot was reproduced in the healthy fish. Pure cultures of the etiological agent were reisolated from the experimentally infected fish, thus fulfilling the requirements of the Koch's Law.

Of the 19 isolated strains which were found to be more or less pathogenic to the grass carp when experimentally tested, strain G₄ was the most virulent, so we made choice of this particular strain for a more thorough study. Emphasis has been placed on its morphology, life cycle including the fruiting body and microcysts, and the formation of columns. The physiological and biochemical properties were also studied.

On the basis of the characteristics of the fruiting body, the present species should be assigned to the family Myxococcaceae of the order Myxobacterales. According to the key to the genera of the family Myxococcaceae proposed by Stanier (1957), the species should be placed in the genus *Myrococcus*, since the fruiting bodies on agar are conical in shape, being surrounded by a thin membrane without any peduncle or branches and are easily deliquescent.

There are now at least six species listed in the genus *Myrococcus* (Stanier, 1957). The present species somewhat resembles *M. xanthus* Beebe (1941) in color and size of the fruiting body, but differs from the latter in the shape and size of the vegetative cell and in the lacking of constriction at the base of the fruiting body, as well as in the habitat. The present species is an animal parasite, whereas the six known species are all found on decaying organic matter in soil or in the dung of various animals. On the ground of these differences, it seems justified to regard it as a new species, for which the name *Myrococcus piscicola*, Lu, Nie & Ko, sp. nov. is proposed.

In connection with the disputes in the literature over the nomenclature and taxonomic position of the well-known etiological agent of "columnaris disease", the following comment may be made. Ordal and Rucker (1944) first isolated an etiological agent in pure culture from the surface lesions of sockeye salmon fingerlings at the U. S. Fish and Wildlife Service hatchery at Leavenworth, Washington, and identified it as *Chondrococcus columnaris* on account of its "columnar or branching fruiting bodies". In reality, the so-called columnar or branching fruiting bodies are not true fruiting bodies at all, because they, in our experience, could never transform into spherical or oval microcysts, and were finally to degenerate into spheroblasts. Ordal and Rucker did isolate strains with definite fruiting bodies from seven Columbia River fishes, but these strains, as they pointed out, exhibited some differences in growth on solid media as compared with the strain of Leavenworth. It is to be regretted that they took it for granted that the strain of Leavenworth would form the same kind of fruiting bodies as the Columbian strains do. Inasmuch as the former is a non-fruiting-body-bearing form and thus should be placed in the genus *Cytophaga*, Garnjobst's (1945) identification as *Cytophaga columnaris* seems to be correct.

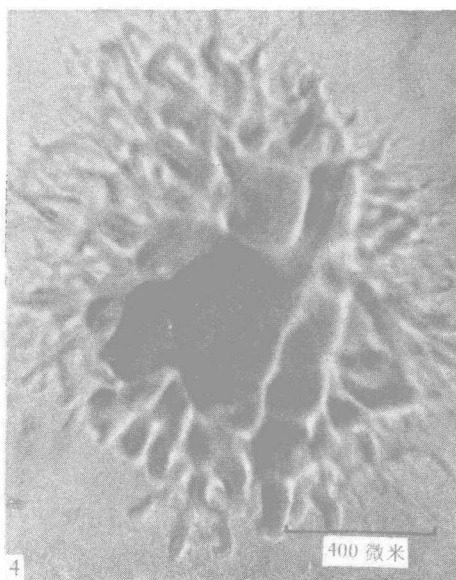
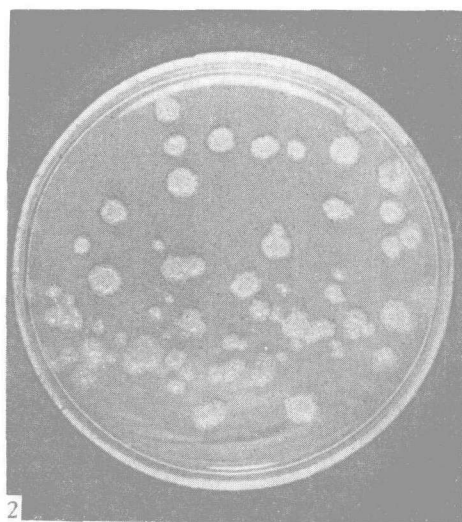
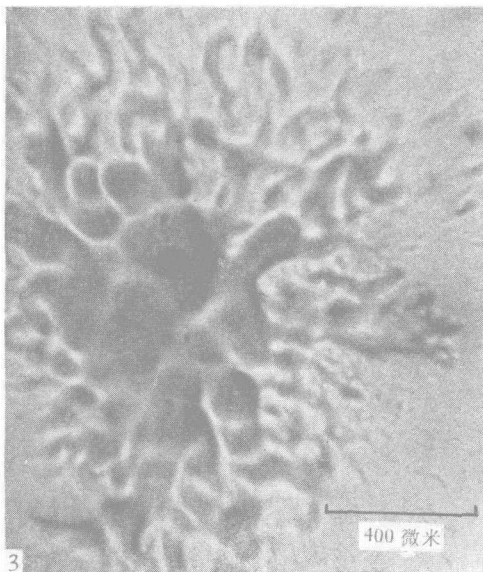
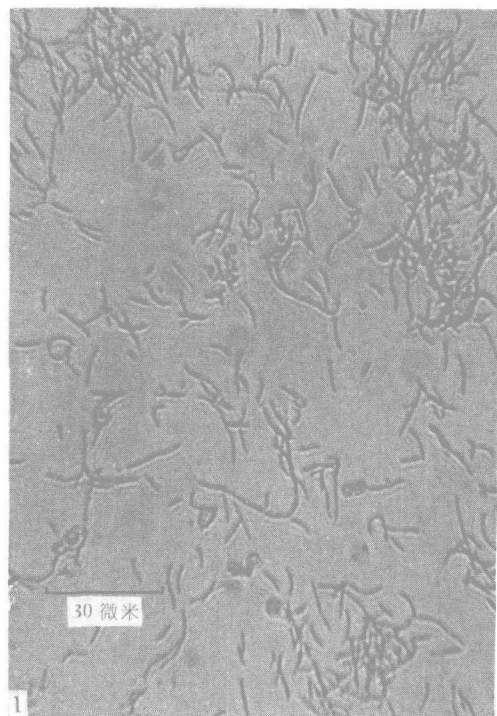


图1 G_4 菌株在胰液液体中培养4天的菌体形态
图2 G_4 菌株在胰液平板上培养3天的菌落形态
图3 G_4 菌株在胰液平板上培养5天的单个菌落形态
图4 G_4 菌株在胰液平板上培养5天的单个菌落形态

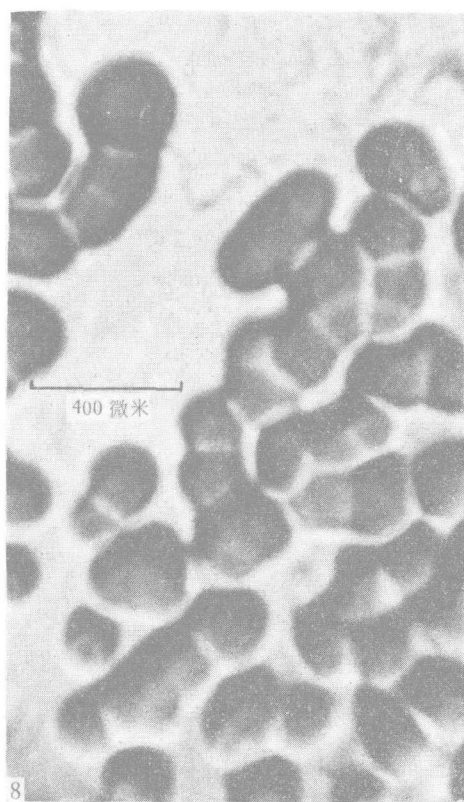
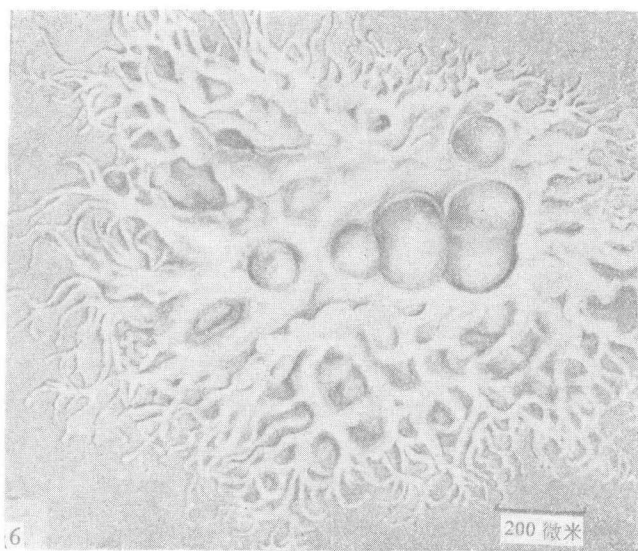
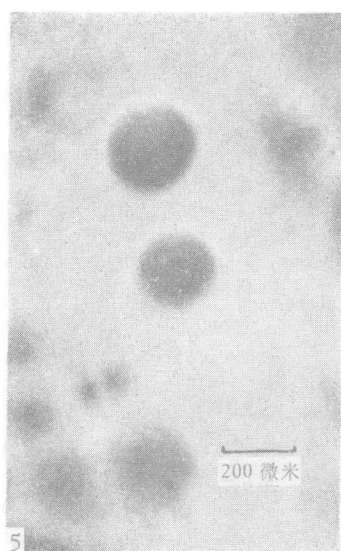


图 5 G_4 菌株在胰脏平板上培养(24—28°C) 6 天的子实体
 图 6 G_4 菌株在胰脏平板上培养(24—28°C) 6 天时单个菌落上的子实体
 图 7 G_4 菌株在胰脏平板上培养 7 天的子实体
 图 8 G_4 菌株在胰脏平板上培养 7 天的子实体

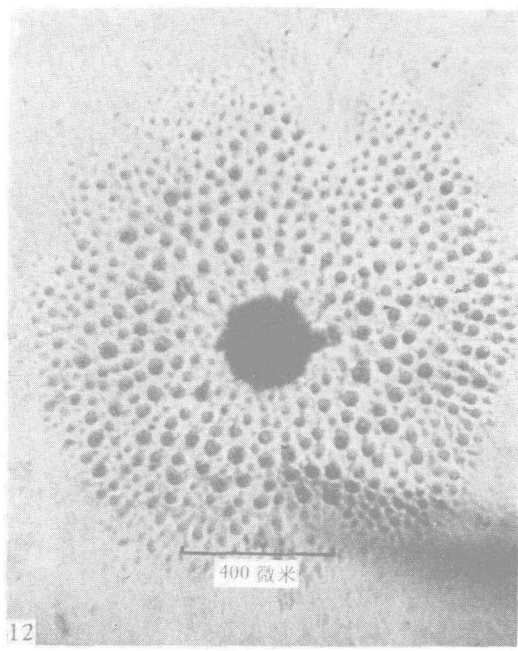
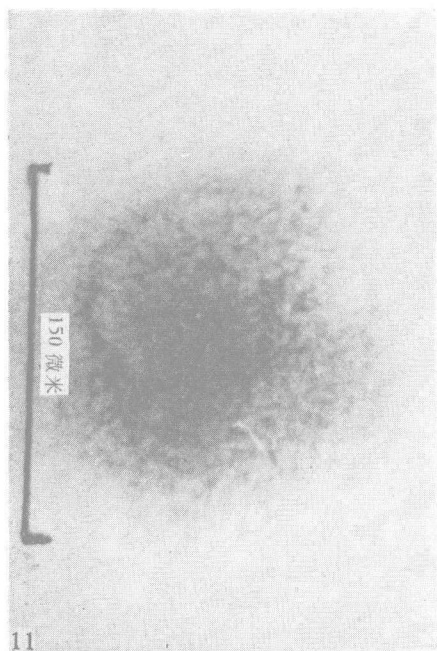
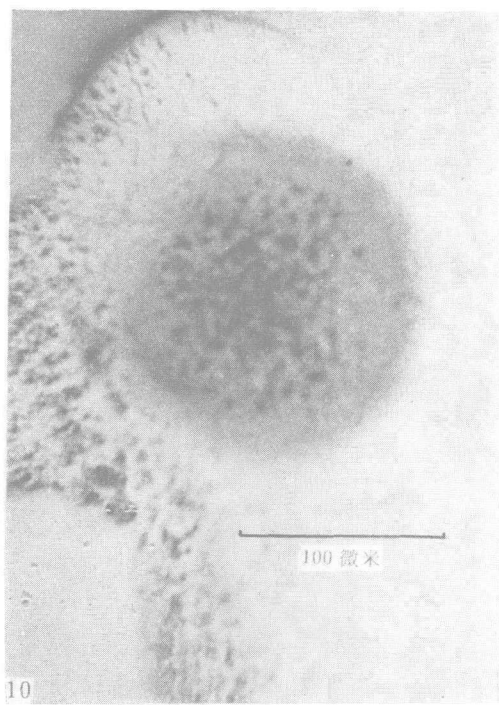
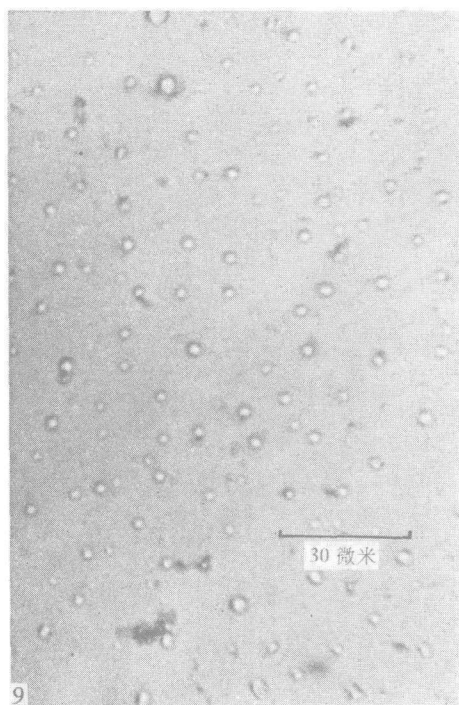


图9 子实体内的小孢子

图10 子实体在胰液培养液中 25℃ 培养 32 小时后小孢子发芽长出大量菌体的情形

图11 子实体在胰液培养液中 25℃ 培养 36 小时后小孢子冲破子实体膜(右上方), 仅留少量菌体的情形

图12 G₄ 菌株在胰液液体培养中在管壁或液面形成的菌团及其散发子菌团的情形

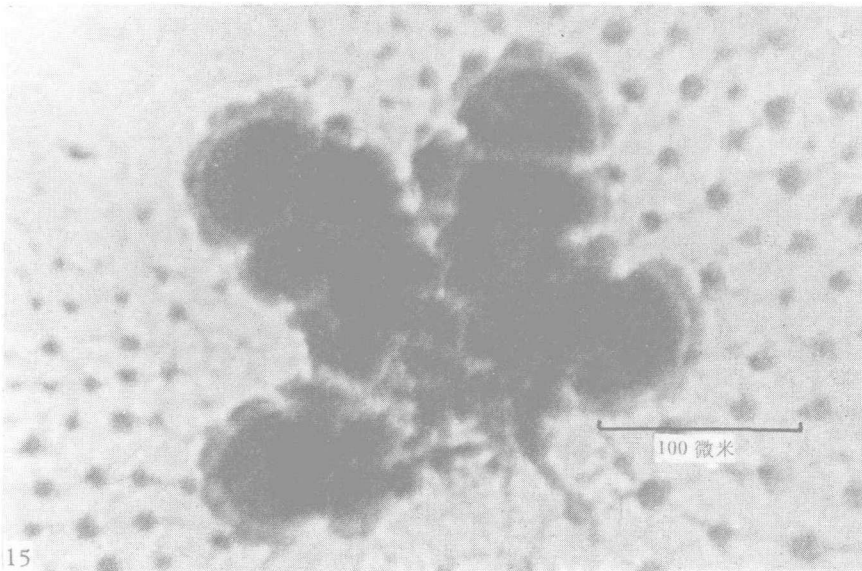
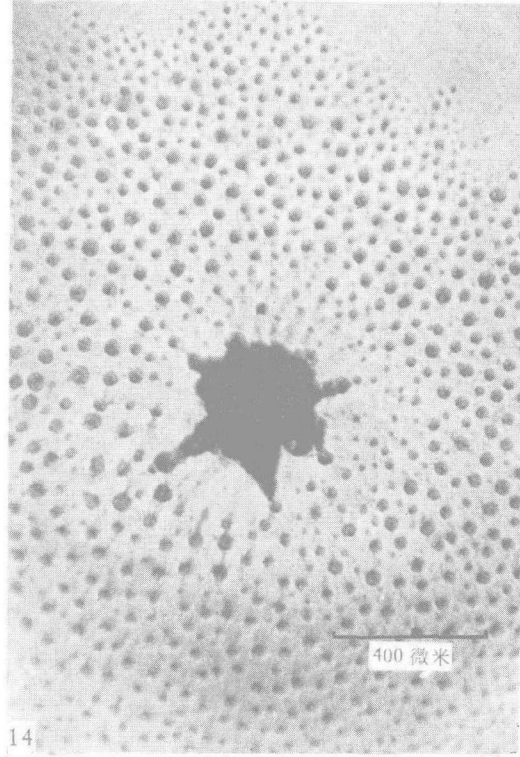
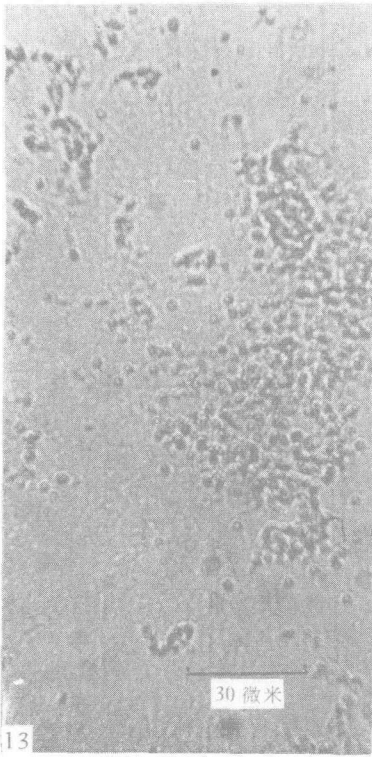


图 13 G₄ 菌株的菌体在衰老阶段, 转化为球质体

图 14 G₄ 菌株在含有代森铵 (0.5—0.8 ppm) 的液体中培养 4 天的菌团及其散发子菌团的情形

图 15 G₄ 菌株在含有代森铵 (0.5—0.8 ppm) 的胰液液体中形成菌团后又散发子菌团的情景

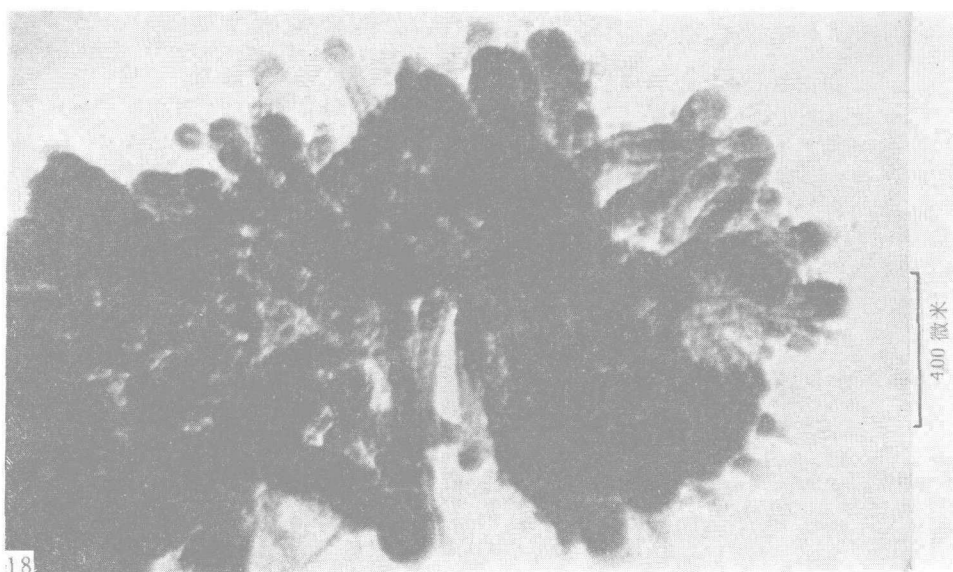
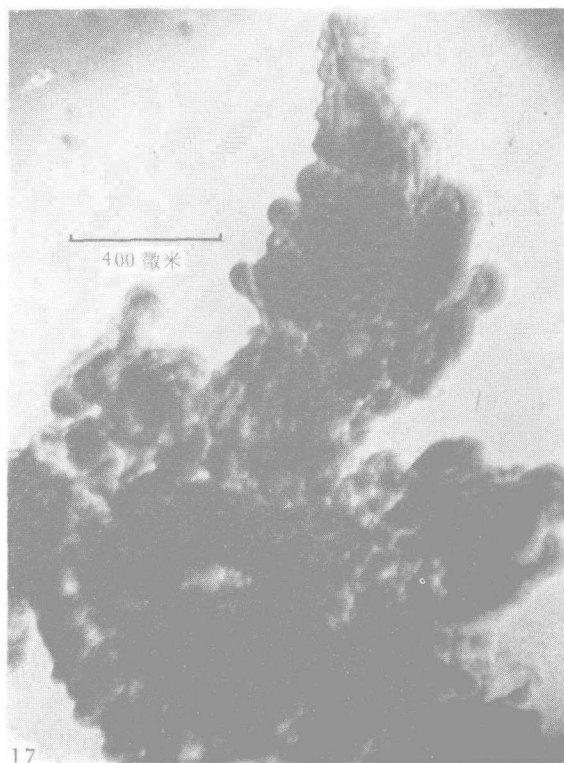
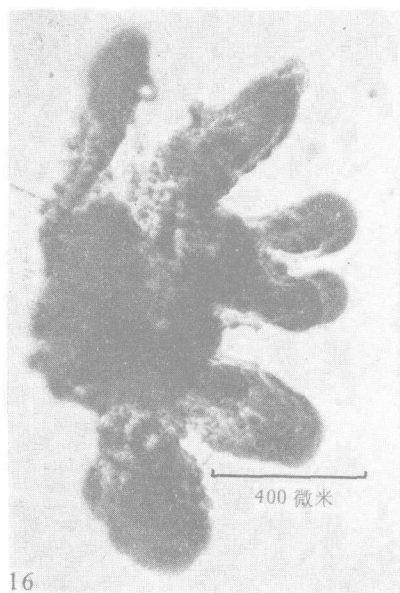


图 16 G_4 菌株在胰脏液体中“柱子”形成的一种形态

图 17 G_4 菌株在含有代森铵 (0.5—0.8 ppm) 的胰脏液体培养中“柱子”形成的复杂形态

图 18 G_4 菌株在含有代森铵 (0.5—0.8 ppm) 的胰脏液体培养中“柱子”形成的又一种形态